

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Monika Horázná

Mechanismy recyklace proteinů z endozómů závislé na retromeru
Mechanisms of retromer - dependent protein recycling from endosomes

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce: Mgr. Marie Macůrková, Ph.D.

Praha, 2011

Děkuji mé školitelce Mgr. Marii Macůrkové, Ph.D. za pomoc, konzultace a čas, který mi věnovala během psaní této práce.

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Praha 5.5.2011

Monika Horázná

Obsah

1. Abstrakt, klíčová slova	...4
2. Seznam zkratek	...6
3. Úvod	...8
4. Endosomy - vznik, maturace a zánik endosomů; TEN	...9
4.1. osud proteinů po vstupu do endosomů	...9
4.2. recyklace na cytoplasmatickou membránu	...10
4.3. transport do TGN	...11
4.4. třídění do multivesicular bodies a funkce ESCRT	...12
5. Proteinové komplexy účastníci se retrográdního transportu z endosomů do <i>trans</i> -Golgi network	...13
5.1. struktura a funkce retromeru	...13
5.2. popis, funkce a interakce jednotlivých podjednotek VPS a SNX	...14
5.3. skládání retromerového komplexu a vznik transportních váčků	...15
5.4. vybrané retrográdní cargo proteiny	...19
5.5. regulace vzniku a odštěpení transportních váčků	...23
6. Závěr	...27
7. Seznam použité literatury	...28

1. Abstrakt

Většina procesů v přírodě je velmi efektivní, co se týče šetření s energií a minimalizace odpadů. Dobrým příkladem úspornosti na buněčné úrovni je recyklace receptorů. Ať již se jedná o receptory lysosomálních enzymů nebo proteinů určených k sekreci, po uvolnění cargo proteinu by byl osud receptoru zpečetěn v lysosomech. Některé transmembránové receptory ovšem obsahují signální motiv, díky kterému jsou rozpoznány určitými proteiny či proteinovými komplexy a degradaci v lysosomech uniknou. Jedním takovým komplexem je retromer. Jeho první objevenou funkcí byla recyklace receptorů lysosomálních hydroláz v kvasinkách. Později se ukázalo, že podobnou roli má i při transportu mnoha jiných proteinů u dalších eukaryot. Úkolem retromeru je tedy vytržít na endosomální membráně dané cargo proteiny a spolu s dalšími pomocnými proteiny vytvořit transportní váček, který následně putuje do Golgi. Díky tomu dochází v buňce k recyklaci proteinů, které by v nepřítomnosti retromeru putovaly z endosomů do lysosomů, kde by byly degradovány.

Klíčová slova:

retromer, retrográdní transport, Vps, SNX, tubulární endosom

Abstract

Most processes in nature are very effective concerning saving energy and minimizing waste. A good example of saving on cellular level is receptor recycling. Whether it concerns receptors for lysosomal enzymes or for proteins destined for secretion, after releasing their cargo protein the fate of the receptor would be sealed in lysosomes. Nevertheless, some transmembrane receptors contain a signal motif through which they are recognized by specific proteins or protein complexes and they escape the degradation in lysosomes. One such complex is the retromer. Its first discovered function was the recycling of receptors for lysosomal hydrolases in yeast. Later it was proved that it has a similar role in transport of many other proteins in other eukaryotes. The task for retromer is to sort the cargo proteins on the endosomal membrane and together with others auxiliary proteins create a transport vesicle which is then transported to the Golgi. This makes the cell able to recycle proteins that would otherwise be transported from endosomes to lysosomes for degradation.

Keywords:

retromer, retrograde transport, Vps, SNX, tubular endosome

2. seznam zkratek:

ALP	alkaline phosphatase
AP	adaptor protein
BAR	Bin/amphiphysin/Rvs
CART	cytoskeleton-associated recycling or transport
CPS	carboxypeptidase S
CPY	carboxypeptidase Y
DPAP A	dipeptidyl aminopeptidase A
EHD	EH domain-containing protein 1
epsinR	epsin-related
ESCRT	endosomal sorting complex required for transport
ETC	endosome-to-TGN transport carrier
GAP	GTPase activating protein
Gap1p	general amino acid permease
GGA	Golgi associated, gamma ear-containing, ADP ribosylation factor-binding
GLUT4	glucose transporter type 4
GSE	GTPase-containing complex required for Gap1p sorting at endosomes
Hrs	hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate
Hsc70	heat shock cognate protein 70
Kex2p	endoproteinase
LDL	low density lipoprotein
LRP	LDL receptor-related protein
M6P	mannose-6-phosphate
MPR	mannose-6-phosphate receptor
CD-MPR	cation-dependent mannose-6-phosphate receptor
CI-MPR	cation-independent mannose-6-phosphate receptor
MVBs	multi-vesicular bodies
PACS1	phosphofurine acidic-cluster sorting protein-1
PI3-K	phosphoinositide 3-kinase
PI(3)P	phosphatidylinositol-3-phosphate
PX	phox homology
RME-8	receptor-mediated endocytosis-8 protein

SNAREs	soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein (NSF) attachment protein receptors
SNX	sorting nexin
TBC1D5	TBC1 domain family, member 5
TEN	tubular endosomal network
TfnR	transferrin receptor
TGN	<i>trans</i> -Golgi network
Tip47	tail-interacting protein, 47 kDa
TSE	tubular-sorting endosome
VPS	vacuolar protein sorting

3. Úvod

Ve své bakalářské práci se věnuji mechanismu recyklace proteinů z endosomů, která je zprostředkována retromerem. V úvodu práce jsou na několika stránkách zmíněny obecné informace o endosomech a o tom, jakými cestami je mohou proteiny opustit. Rozhodně se nejedná o vyčerpávající shrnutí celé problematiky, zaměřuji se spíše na zajímavé, důležité či typické příklady. Hlavní část mé práce pojednává o retromeru – proteinovém komplexu, který zajišťuje retrogradní transport z endosomů do pozdního Golgi. Dráhy recyklace proteinů z endosomů byly studovány na mnoha modelových organismech. Jelikož množství článků na toto téma přesahuje rozsah pro bakalářskou práci, zaměřuji se na dva nejčastěji zkoumané modely – *S. cerevisiae* a savčí buňky.

4. Endosomy - vznik, maturace a zánik endosomů; TEN

Endosomy primárně vznikají vchlípením a následným odškrcením plasmatické membrány. Dříve byla představa taková, že jednotlivé endosomální kompartmenty jsou stabilní (např. časné, pozdní a recyklující endosomy) a proteiny se mezi nimi pohybují pomocí transportních váčků. Později se ukázalo, že endosomy procházejí maturací a jsou spojeny ohromnou tubulární sítí, jejíž membránová plocha dalece předčí membránu vakuolárního endosomu. Toto vede k myšlence o existenci TEN (tubular endosomal network), rozsáhlé síti vedoucí z endosomů, která třídí cargo molekuly do různých destinací, včetně TGN, plasmatické membrány, lysosomů a skladovacích vezikulů. TEN tedy není jen recyklující, ale i třídící kompartment, který asociuje s množstvím třídících zařízení jako je retromer, klathrin, AP1 (adaptor protein 1), epsinR (epsin-related), GGA (Golgi associated, gamma ear-containing, ADP ribosylation factor-binding) proteiny, AP3 (adaptor protein 3) nebo dynamin.

V buňce se tedy nachází dva typy endosomů, které se od sebe na první pohled liší svým tvarem – vakuolární endosomy kulovitěho tvaru a tubulární endosomy tvořící síť nazvanou TEN. Cargo molekuly nejdříve vstupují do endosomálního systému na úrovni časného vakuolárního endosomu. Tento endosom zraje do stádia pozdního endosomu, kdy se v jeho lumen vytvoří drobné váčky a z jeho povrchu vyrostou tubuly. Cargo molekuly, které zůstanou uvnitř endosomu, budou dopraveny do lysosomu. Ty, které se dostanou do TEN, jsou recyklovány. Odstranění recyklujících proteinů z endosomu předchází jeho maturaci. V rámci TEN následuje další třídění, jehož výsledkem je transport recyklovaných molekul do příslušných buněčných kompartmentů (Bonifacino and Rojas 2006; Johannes and Popoff 2008; Seaman 2008).

4.1. osud proteinů po vstupu do endosomů

Vzhledem ke způsobu svého vzniku obsahují endosomy řadu membránových proteinů. Další proteiny se do endosomů dostávají z vnitřních buněčných kompartmentů, především z Golgiho komplexu. Část proteinů obsažených v endosomech je určena k degradaci, některé proteiny jsou však recyklovány a transportovány do jiných kompartmentů k dalšímu využití. Hlavními cestami recyklace proteinů jsou zpětný transport proteinů na plasmatickou membránu a transport proteinů do Golgiho komplexu.

4.2. recyklace na cytoplasmatickou membránu

Návrat endocytovaných proteinů na cytoplasmatickou membránu je důležitý pro udržení určité hladiny aktivních receptorů na buněčném povrchu. Tyto receptory vychytávají důležité makromolekuly a zajišťují další fyziologicky důležité procesy. Např. rychlou dráhu recyklace transferrinového receptoru (TfnR) umožňují v savcích buňkách periferní časné endosomy díky komplexu CART (cytoskeleton-associated recycling or transport). Jeho vyřazení z funkce má za následek recyklaci TfnR pomalou cestou přes perinukleární endosomy. Klíčovou komponentou perinukleárních recyklujících endosomů je malá GTPáza rab11, která má mnoho interagujících proteinů: exocytický komplex, který zprostředkovává fúzi s plasmatickou membránou, myosin Vb a Fip2, který interaguje s EHD1 (EH domain-containing protein 1) a EHD3. EHD1 funguje mj. při recyklaci z endosomu na plasmatickou membránu a je důležitý pro udržování MHC třídy I a β -integrinu na plasmatické membráně.

Jak jsou proteiny tříděny do dráhy recyklující z endosomů na plasmatickou membránu, není zcela jasné, nicméně jsou známy některé komponenty mašinerie, která tento proces zprostředkovává. Jako příklad lze uvést SNX17 (sorting nexin), který zprostředkovává návrat proteinu odvozeného od receptoru pro LDL (LDL= low density lipoprotein; LRP = LDL receptor-related protein). Není ovšem jasné, zda se tak děje přímo, nebo je-li LRP sortován do TGN a odtud resekretován na plasmatickou membránu. Jiné využití dráhy endosomy-plasmatická membrána je u glukózového transportéru GLUT4 (glucose transporter type 4). Ve svalových a tukových buňkách je intracelulární zásobárna těchto receptorů, ze které mohou být translokovány na membránu po stimulaci buňky inzulinem. Klíčovým prostředníkem je zde opět malá GTPáza rab11. U *S. cerevisiae* rostoucích v médiu bohatém na dusík je Gap1p (general amino acid permease), obecná permeáza aminokyselin, rychle degradována. Za podmínek hladovění na dusík je tato permeáza tříděna komplexem GSE (GTPase-containing complex required for Gap1p sorting at endosomes), lokalizovaným na endosomech, do plasmatické membrány, kde může vychytávat všechny dostupné aminokyseliny a dopravovat je do buňky. Tato recyklace nezahrnuje návrat do Golgi (Seaman 2008).

4.3. transport do TGN

Existuje několik cest pro transport z endosomů do TGN (trans-Golgi network) a některé cargo molekuly jsou schopné využívat více než jednu. Retrográdní transport z endosomů do TGN je zásadní pro recyklaci proteinů, zejména receptorů různých enzymů působících v lysosomech. U kvasinek je takovýmto důležitým proteinem receptor karboxypeptidázy Y (CPY = carboxypeptidase Y), Vps10p (vacuolar protein sorting 10). U savčích buněk jsou typickým příkladem M6P receptory (MPRs = mannose-6-phosphate receptors). V obou případech se na receptory váží v pozdním Golgi resp. TGN lysosomální hydrolázy, které jsou za pomoci GGA proteinů dopraveny v klathrinových váčcích do endosomů. Po odpojení ligandu jsou receptory navraceny do pozdního Golgi resp. TGN, kde mohou podstoupit další kolo transportu hydroláz. Návrat je umožněn proteinovým komplexem retromerem, kterému bude věnována následující kapitola (Seaman 2005; Seaman 2008).

Kromě retromeru je pro úspěšnou recyklaci proteinů potřeba řada dalších transmembránových proteinů, které cyklují mezi endosomy a TGN. Jedná se zejména o proteiny z rodiny SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein (NSF) attachment protein), transmembránové proteiny zakotvené do membrány většinou svým C-koncem a větší částí exponované do cytosolu. V nejjednodušším modelu jejich funkce existují specifické v-SNARE proteiny na membráně váčku pučícího z TGN, které se spojují s t-SNARE proteiny na cílové membráně endosomů. Jejich interakci je zprostředkována fúze membrán. Podobně váčky nesoucí recyklované proteiny z endosomů musí obsahovat specifické v-SNARE proteiny, které jim umožní interagovat s t-SNARE proteiny na TGN (Bonifacino and Glick 2004; Bonifacino and Rojas 2006).

Dalšími proteiny důležitými pro retrográdní transport jsou různé adaptorové proteiny a enzymy. PACS1 (phosphofurine acidic-cluster sorting protein-1) je cytosolický linker, který váže cytosolické domény transportovaných proteinů a spojuje je s adaptorovými proteiny. Ty dále propojují celý proteinový komplex s obalovými proteiny, jako je klathrin. Příkladem adaptorového proteinu je AP1. S proteiny PACS1 a AP1 se váže i klathrinový adaptor epsinR. Na retrográdním transportu MPR receptorů se také podílí malá GTPáza Rab9 a její efektor TIP47 (tail-interacting protein, 47 kDa), jehož úlohou je rozpoznávat cargo proteiny. Podle dat z některých studií se zdá, že PACS1/AP1 zajišťuje recyklaci z časných endosomů a Tip47/Rab9 z pozdních endosomů (Ghosh et al. 2003; Bonifacino and Rojas 2006).

4.4. třídění do multivesicular bodies a funkce ESCRT

Jak již bylo řečeno, z morfologického hlediska existují 2 typy endosomů, tubulární a vezikulární. Tubulární části endosomů vychází z vezikulárních a tvoří tubulární endosomální síť, TEN. Vezikulární endosomy dále většinou obsahují další vnitřní váčky a takovéto struktury se nazývají multi-vesicular bodies (MVBs). Existují čtyři odlišné ESCRT komplexy (endosomal sorting complex required for transport) tvořené Vps proteiny, které zprostředkovávají tvorbu vnitřních váčků MVB váčků a zároveň i třídění proteinů, které do vnitřních váčků putují. Klíčové pro třídění proteinů dovnitř váčků je jejich předchozí označení ubiquitinem. Existují dva modely funkce ESCRT komplexů. Podle prvního z nich se jedná o lineární mechanismus, kdy komplex ESCRT-0 rozpoznává ubiquitinylovaný protein a předává ho komplexu ESCRT-I, odkud jde přes ESCRT-II na ESCRT-III. Tento model se zdá být jednoduchý, avšak nevysvětluje vznik vnitřních váčků. Alternativní model funkce ESCRT komplexů předpokládá vytvoření prstencové struktury z ESCRT-I, ESCRT-II a ESCRT-III a s ESCRT-0 uprostřed prstence. Ubiquitinylované proteiny by byly směřovány a koncentrovány doprostřed a potom natlačeny dovnitř pučícího váčku. „Stažením“ prstencové struktury může dojít k vytvoření a odštěpení vnitřního váčku. Oba modely jsou koncepčně v pořádku a existují data pro podporu obou (Seaman 2008; Raiborg and Stenmark 2009; Hurley and Hanson 2010).

Třídění proteinů do MVB váčků a jejich následné doručení do lumen lysosomů představuje u všech eukaryot jeden z mechanismů degradace proteinů. Do MVB váčků tedy přichází molekuly určené k degradaci, ať již se jedná o endocytované molekuly nebo o vlastní proteiny, které buňka metabolizuje z důvodu jejich poškození či nadbytečného množství. Druhým typem proteinů, které prochází cestou z endosomů přes MVB váčky do lysosomů, jsou enzymy funkční v lysosomech, např. kyselé hydrolázy či různé peptidázy (Piper and Katzmann 2007).

5. proteinové komplexy účastníci se retrográdního transportu z endosomů do *trans*-Golgi network

Transportní cesty mezi časnými či recyklujícími endosomy a TGN zahrnují pučení transportních váčků obalených membránou z endosomů a následnou fúzi těchto váčků s TGN. Bylo popsáno mnoho komponent molekulárních mašinerií, které se na tomto procesu podílejí. Retrográdní transport z časných endosomů je u mnoha cargo molekul řízen právě retromerem.

5.1. struktura a funkce retromeru

Retromer je fylogeneticky konzervovaný proteinový komplex, který zajišťuje retrográdní transport transmembránových cargo proteinů z endosomů do TGN resp. do pozdního Golgi (přehledně v Bonifacino and Hurley 2008; Collins 2008).

První důkazy o tom, že retromer hraje důležitou roli při třídění proteinů z endosomů do Golgi, vzešly ze studie na *S. cerevisiae*. Na základě analýzy mutantů pro různé *vps* geny bylo objeveno 5 proteinů, které jsou všechny nezbytné pro účinnou recyklaci receptorů různých lysosomálních enzymů z endosomů do pozdního Golgi: Vps5p, Vps17p, Vps26p, Vps29p a Vps35p. Později se ukázalo, že tyto proteiny vytvářejí heteropentamerický komplex, který byl pojmenován jako retromer. Vps26p, Vps29p a Vps35p tvoří jádro retromeru, které interaguje s dimerem Vps5p/Vps17p. Tyto dva subkomplexy se skládají za vzniku multimerního komplexu na prevakuolární membráně (Seaman et al. 1998).

Pozdější studie ukázaly, že retromer je konzervovaný i u vyšších eukaryot. U savců má dokonce esenciální funkci. Lidské orthology kvasinkových podjednotek se označují VPS26, VPS29 a VPS35 (Haft et al. 2000). Za savčí orthology Vps5p jsou považovány SNX1 a SNX2 (Horazdovsky et al. 1997; Haft et al. 1998). Pozdější studie ukázaly, že SNX1 a SNX2 fungují z části redundantně (Schwarz et al. 2002) a že SNX2 není za všech okolností nezbytný pro správnou funkci retromeru (Carlton et al. 2005). V retromerovém komplexu se navíc můžou nacházet i další proteiny z rodiny sorting nexins, SNX5 a SNX6, které se zdají být savčími orthology Vps17p (Wassmer et al. 2007). Pozdější práce dokonce ukazuje, že v savčích buňkách existují čtyři možné kombinace pro vytvoření heterodimeru SNX: SNX1/SNX5, SNX1/SNX6, SNX2/SNX5 a SNX2/SNX6. Tyto kombinace tedy určují další čtyři typy retromeru vedle typů se SNX homodimery. Tato skutečnost potvrzuje představu, že SNX1 a SNX2 představují savčí orthology kvasinkového Vps5p a SNX5 a SNX6 orthology

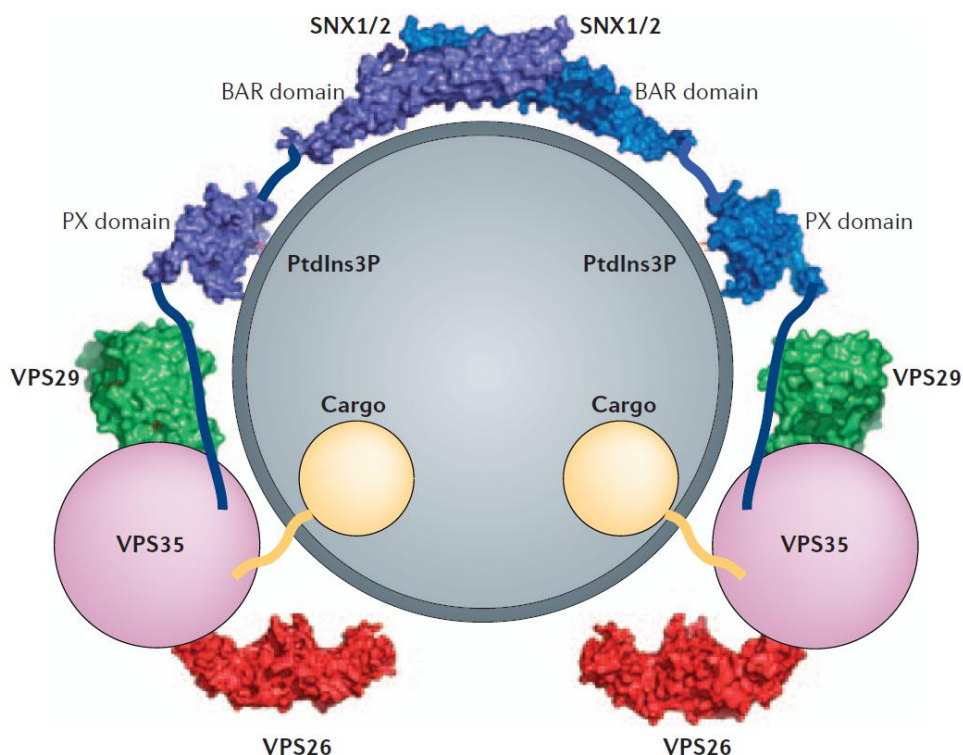
Vps17p (Wassmer et al. 2009). Vše je také v souladu s myšlenkou funkční redundance SNX1 a SNX2 (Schwarz et al. 2002; Griffin et al. 2005; Rojas et al. 2007).

5.2. popis, funkce a interakce jednotlivých podjednotek VPS a SNX

Podjednotky retromerového jádra VPS26, VPS29 a VPS35 jsou hydrofilní proteiny o velikosti 327, 182 resp. 796 aminokyselin. Pomocí kvasinkového dvouhybridového systému (Y2H = yeast two hybrid) byly prokázány interakce mezi jednotlivými podjednotkami retromeru. VPS35 se může přímo vázat na SNX1, VPS26 i VPS29 a proto nejspíš slouží jako jádro pro skládání retromerového komplexu (Obr. 1). VPS26 se váže na N-terminální část VPS35 (aminokyseliny 54-172), zatímco VPS29 váže C-terminální část VPS35 (aminokyseliny 307-796). Toto je v souladu s modelem, kdy VPS35 váže zároveň jak VPS26, tak VPS29. Navíc VPS26 a VPS29 jsou schopné vzájemné vazby, která by mohla dále stabilizovat celý komplex. SNX1 se váže na prvních 53 aminokyselin VPS35 a SNX jsou při uskutečňování této vazby již pravděpodobně ve formě dimerů (mohou tvořit jak homodimery, tak heterodimery). Slabá vazebná interakce, která podporuje stabilitu komplexu, existuje i mezi SNX1 a VPS26. (Haft et al. 2000)

SNX1, SNX2, SNX5 a SNX6 patří do rodiny sorting nexins, pro kterou je typická přítomnost PX domény (phox homology). PX doména dává těmto proteinům schopnost vázat se na membrány prostřednictvím PI(3)P (phosphatidylinositol-3-phosphate) a dalších fosfoinositidů (přehledně v Carlton et al. 2005a; Cullen 2008). Během studia PX domény kvasinkového Vps5p se ukázalo, že správně fungující PX doména je nezbytná pro správné navázání Vps5p k endosomům, což je předpokladem pro účinné třídění CPY (carboxypeptidase Y). Při mutaci PX domény, která zabraňuje vazbě na PI(3)P (Vps5^{Y322A,R360A}), dochází k silnému defektu ve zpracování CPY, podobně jako při celkové deleci genu *vps5* (Burda et al. 2002). Další důležitou částí některých SNX proteinů je BAR doména (Bin/amphiphysin/Rvs), která umožňuje dimerizaci SNX. BAR doména také rozpoznává ohyby v membráně a u některé SNX proteiny pomocí této domény řídí membránovou tubulaci (Carlton et al. 2004). Dosud není zcela jasné, které všechny SNX proteiny mohou fungovat jako součást savčího retromeru. Jisté je to, že u savců je SNX1 pro funkci retromeru nezbytný (Carlton et al. 2004), a že asociace SNX1 s membránou je nezávislá na SNX2 (Carlton et al. 2005b). Umlčení SNX2 také nezpůsobuje znatelné narušení normální distribuce CI-MPR (cation-independent mannose-6-phosphate receptor), proto pokud je SNX2 součástí retromeru, má v něm zřejmě za určitých okolností pouze minoritní

funkci (Carlton et al. 2005b). Na druhou stranu se zdá, že během embryonálního vývoje myši je funkce SNX2 pro aktivitu retromeru důležitější než SNX1 (Griffin et al. 2005).



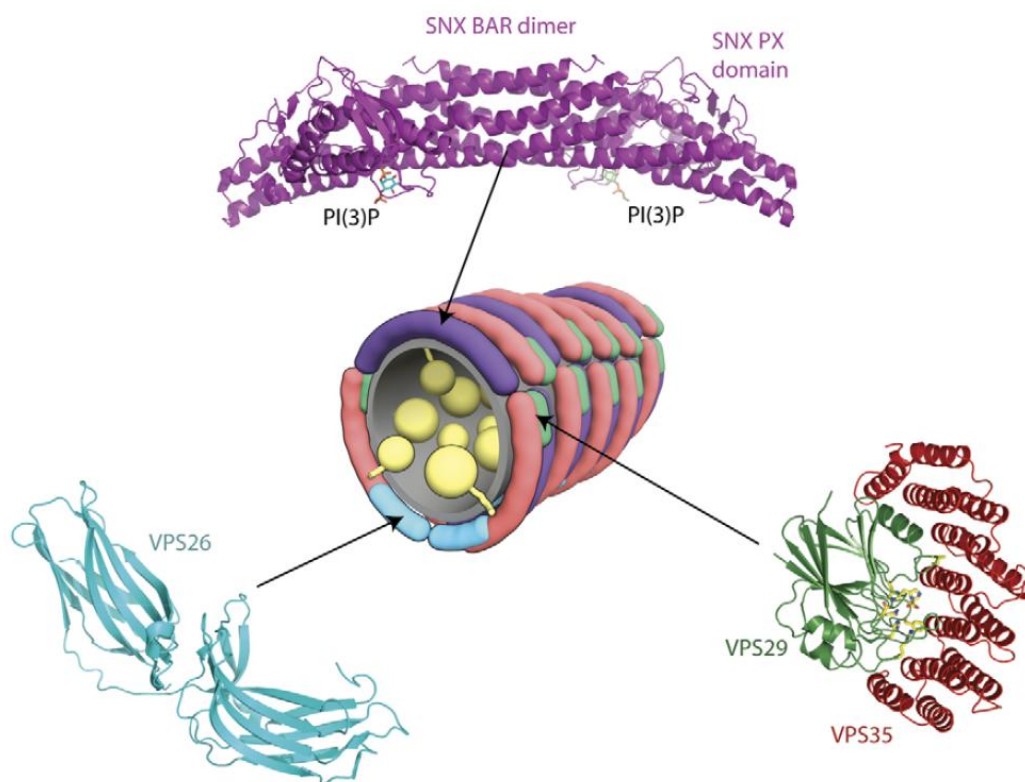
Obr. 1: **Funkční model retromeru.** Na obrázku je znázorněn model skládání a funkce savčího retromeru. Subkomplexy SNX1/SNX2 jsou v tomto modelu navázány na membránu díky interakci mezi PX a BAR doménami s membránovými fosfolipidy. Subkomplex VPS26/VPS29/VPS35 je rekrutován prostřednictvím interakcí s SNX1 a SNX2. Jakmile je VPS35 na svém místě, naváže cargo protein určený k retrográdnímu transportu do membránové domény obalené retromerem.
(převzato z Bonifacino and Rojas 2006)

5.3. skládání retromerového komplexu a vznik transportních váčků

Vznik a rozpad retromeru je dynamický proces probíhající na membráně i mimo ni. (Seaman et al. 1998)

Jak již bylo řečeno, základním předpokladem pro složení celého komplexu je schopnost Vps35p interagovat s ostatními podjednotkami retromeru (Haft et al. 2000). Prvním krokem při skládání retromeru je navázání dimeru SNX na membránu endosomu a její zakřivení. Toho jsou SNX schopny díky svým BAR doménám (Carlton et al. 2004) a na membráně se

udrží díky vazbě PX domény na PI(3)P (Obr. 2) (Ponting 1996). Obdobně u kvasinek dochází k vytvoření dimeru Vps5p/Vps17p (Horazdovsky et al. 1997) a jeho navázání na membránu endosomu (Burda et al. 2002).



Obr. 2: **Struktura retromeru.** Podjednotky retromeru jsou znázorněny ve své krystalové struktuře. VPS26, VPS29 a VPS35 jsou obarveny modře, zeleně resp. červeně. Struktura SNX dimeru je reprezentována krystalovou strukturou SNX9 v barvě fialové, tyčkovým modelem jsou znázorněny molekuly fosfatidylinositol-3-fosfátu (PI(3)P). Struktury jsou ukázány ve vztahu k hypotetickému modelu retromerového obalu vázaného na membránové tubuly.

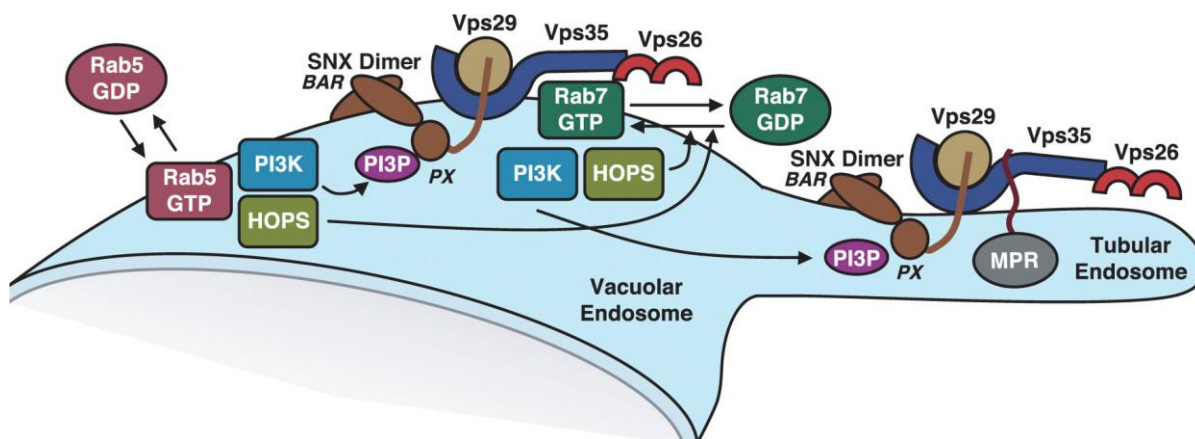
(převzato z Bonifacino and Hurley 2008)

Aby mohlo k vazbě PX domén na membránu endosomu vůbec dojít, musí v ní být zvýšené množství PI(3)P. U kvasinek je PI(3)P syntetizován komplexem II, jehož součástí je Vps34p – jediná PI3-kináza *S. cerevisiae* (Backer 2008). Spolu s Vps34p se v komplexu II nachází další Vps proteiny: Vps15p, Vps30p a Vps38p. Fenotypová analýza buněk mutantních v genu *vps30* ukázala podobné fenotypy jako u mutantů v retromeru. Buňky s mutací v genu *vps30* i *vps38* mají narušenou recyklaci cargo proteinů z endosomů do Golgi, konkrétně u $\Delta vps30$ i $\Delta vps38$ kmenů byl prokázán defekt v recyklaci Vps10p a Kex2p (endoproteáza, která cykluje, podobně jako Vps10p, mezi Golgi a endosomy). Navíc v těchto kmenech byla prokázána

lokalizace Vps5p a Vps17p do cytosolu, nejspíš z důvodu jejich neschopnosti navázat se na membránu endosomů (Burda et al. 2002).

Navázání retromeru na membránu endosomů je vysoce regulovaný proces, ve kterém hrají důležitou roli dvě malé GTPázy, Rab5 a Rab7. Model regulace retromeru GTPázami Rab5 a Rab7, jak ho představuje Rojas, vypadá následovně:

Výměna GDP za GTP způsobí asociaci Rab5 s časnými endosomy a rekrutování dalších efektorových proteinů (Obr. 3 – levá část). Hlavním efektem Rab5 je PI3-K (phosphoinositide 3-kinase) třídy III, která je v savčích buňkách složená z katalytické podjednotky VPS34 a regulační podjednotky VPS15/p150. PI3-K fosforyluje fosfatidylinositol na PI(3)P, čímž obohacuje endosomální membrány o tento fosfoinositid. Na PI(3)P se dále navazují další efektorové proteiny, mezi nimi i SNX subkomplex. SNX proteiny se vážou na PI(3)P díky svým PX doménám a ohýbají membránu svými BAR doménami. SNX subkomplex přispívá k vazbě Vps subkomplexu, ale vazby mezi těmito dvěma částmi retromeru jsou příliš slabé, aby zajistily stabilní asociaci Vps subkomplexu s membránou endosomu. Zde přichází na řadu Rab7 a Vps-C komplex, který funguje jako vyměňovač guaninových nukleotidů. Po výměně GTP za GDP se Rab7 váže na membránu a slouží jako další bod pro uchycení Vps subkomplexu (Obr. 3) (Rojas et al. 2008).

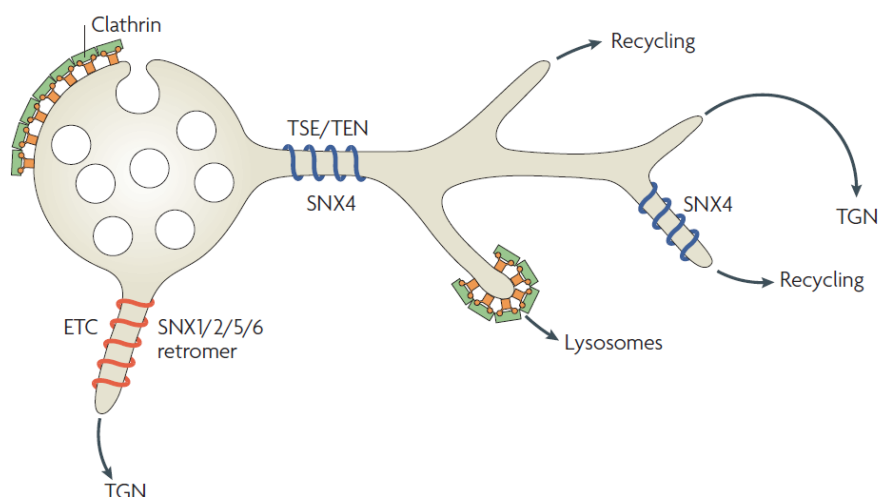


Obr. 3: **Schematické znázornění regulace retromeru GTPázami Rab5 a Rab7.** Schéma zobrazuje endosom v obou možných vzhledech, kterých může nabývat – vakuolárním a tubulárním. Sled reakcí je prezentován v kontextu vývoje endosomu od Rab5- pozitivního k Rab7- pozitivnímu a od vakuolárního vzhledu endosomu k vzhledu tubulárnímu. Detaily modelu jsou vysvětleny v textu.

dosud nezmíněné zkratky: HOPS = homotypic fusion and vacuole protein sorting
(převzato z Rojas et al. 2008)

Dalšího hráče do celého procesu regulace přináší Seaman et al. Ve své práci se zaměřili na Rab7 a TBC1D5 (TBC1 domain family, member 5), nově objevený protein interagující s retromerem. TBC1D5 je členem rodiny proteinů Rab GAP (GTPase activating protein) a reguluje tedy aktivitu Rab stimulací hydrolýzy GTP. Při nadměrné expresi TBC1D5 došlo v buňkách k odstranění Rab7 z membrán, na Rab5 ani na Rab9 neměla nadměrná exprese žádný vliv. Pozorovaný efekt by mohl být dán i nepřímým vlivem TBC1D5 na Rab7, nicméně u *C. elegans* se homolog TBC1D5 (kódovaný genem *rbg-3*) chová vůči Rab7 jako GAP (viz. diskuze v článku Seaman et al. 2009) a je tedy pravděpodobné, že u savců tomu bude také tak. Odstranění Rab7 z buněk mělo za následek méně stabilní asociaci VPS26/VPS29/VPS35 s membránou, nicméně celý subkomplex byl stále funkční a schopný třídit cargo molekuly. Zdá se tedy, že rekrutování VPS26/VPS29/VPS35 na membránu je katalyzováno Rab7 a inhibováno TBC1D5 (Seaman et al. 2009).

Mari et al. ve své nedávné práci představili možný nový způsob retrográdního transportu receptorů lysosomálních proteinů. Na základě studia sortilinu a jemu nepříbuzných M6P receptorů charakterizovali nový typ transportních váčků, ETC (endosome-to-TGN transport carrier). Ačkoli ETC váčky také vznikají z časných endosomů (Obr. 4), jsou morfologicky odlišné od dříve popsaného TSE (tubular-sorting endosome) či TEN, navíc podle citované práce jediná proteinová mašinerie na ETC váčcích jsou SNX1 a SNX2. ETC váčky se vytvářejí v přítomnosti SNX1 na časných endosomech a v menším měřítku i na pozdních endosomech. ETC váčky pučí ze stejných endosomů jako TSE/TEN (Mari et al. 2008). Zatím není jasné, zda transport pomocí ETC váčků zahrnuje i přímou fúzi s membránou TGN, nebo jestli je v této dráze zahrnutý nějaký další člen. Nicméně zatímco Mari et al. na ETC uvádí pouze přítomnost SNX1 a SNX2, Cullen (Cullen 2008) uvádí i přítomnost retromeru, SNX5 a SNX6. Je zřejmé, že pro lepší charakterizaci ETC váčků budou nezbytné další studie.



Obr. 4: **Třídění proteinů v rámci endosomů pomocí tubulů.** Časné endosomy obsahují řadu tubulárních subdomén, jako ETCs (endosome-to-TGN transport carriers) a TSE (tubular sorting endosome) /TEN (tubular endosomal network). Přesná úloha SNX4 při třídění přes TSE/TEN zatím není zcela objasněná. Dvouvrstvá klathrinového obalu je zahrnuta v třídění cargo molekul do časných endosomů a v regulaci vzniku struktur, které směřují cargo molekuly dále do lysosomů. Třídění cestou přes TSE/TEN se děje v časných stádiích procesu maturace, zatímco frekvence ETC váčků je nejvyšší u těch endosomů, které obsahují velké množství vnitřních váčků, což se děje v pozdní fázi maturace časných endosomů (Cullen 2008).

5.4. vybrané retrográdní cargo proteiny

Asi nejlépe prostudovanými cargo proteiny retrográdního transportu jsou intracelulární receptory zodpovědné za transport lysosomálních enzymů, jako Vps10p kvasinky *S. cerevisiae* a savčí CI-MPR (cation-independent mannose-6-phosphate receptor) a CD-MPR (cation-dependent mannose-6-phosphate receptor) (Horazdovsky et al. 1997; Arighi et al. 2004; Seaman 2004). Další často studované proteiny procházející cestou retrográdního transportu jsou sortilin, A-ALP, Shiga toxin, ricin, TGN38 a Wntless. Obecně platí, že cargo molekuly určené k recyklaci jsou rozpoznávány různými retrográdními komplexy díky krátkým peptidovým motivům na cytoplasmatických koncích (Bonifacino and Traub 2003). V případě retromeru nebyl dosud popsán žádný konkrétní motiv, ať už sekvenční či strukturní, který by byl společný všem molekulám, které jsou jeho prostřednictvím transportované.

Vzhledem k tomu, že retromer rozpoznává cargo proteiny díky interakci s Vps35p resp. VPS35 (Nothwehr et al. 2000), stala se tato podjednotka a její interakce s jinými molekulami předmětem studia několika vědeckých skupin. Interakce VPS35 a CI-MPR byla studována ve dvou laboratořích s odlišnými výsledky: pomocí kvasinkového dvouhybridového systému (Arighi et al. 2004) a metodou imunoprecipitace (Seaman 2007). Studium interakcí jednotlivých částí CI-MPR a VPS35 byly objeveny dva úseky CI-MPR, aminokyseliny 48-80 a 80-100, které interagují s úsekem aminokyselin 500-693 na C-konci VPS35 (Arighi et al. 2004). Imunoprecipitací byl v koncovém úseku CI-MPR objeven motiv ⁴²WLM⁴⁴, který zodpovídal za interakci s retromerem a transport do TGN (Seaman 2007).

Na základě znalosti motivu ⁴²WLM⁴⁴ u CI-MPR byl provedeno srovnání sekvencí cytoplasmatického konce sortilinu od různých druhů. V sekvenci sortilinu byl objeven motiv ⁹FLV¹¹, který je biochemicky velmi podobný motivu ⁴²WLM⁴⁴ v CI-MPR. V buňkách s mutací v tomto motivu, kde byly tři aminokyseliny Phe-Leu-Val vyměněny za tři Ala (FLV-AAA), nedocházelo k úspěšnému návratu reportérového proteinu (CD8-FLV-AAA)

z endosomů do TGN. Stejný defekt se dostavil i v případě mutace v CI-MPR (WLM-AAA) a sledování reportérového proteinu CD8-WLM-AAA (Seaman 2007). Druhým popsáním motivem důležitým pro vazbu sortilinu s retromerem je $^{14}\text{YSVL}^{17}$ (Canuel et al. 2008).

U kvasinek byl zkoumán transport dvou proteinů, A-ALP a Vps10p. Kvasinkový gen *vps10* kóduje transmembránový receptor pro CPY (Marcusson et al. 1994). Studium tohoto receptoru přispělo významným dílem k poznání dráhy retrográdního transportu. A-ALP je modelový membránový protein TGN vytvořený fúzí N-terminální cytosolické domény DPAP A (dipeptidyl aminopeptidase A) a transmembránové a lumenální domény ALP (alkaline phosphatase). Za správný návrat A-ALP a Vps10p z prevakuolárních kompartmentů do Golgi se ukázala být zodpovědná podjednotka retromeru Vps35p (Nothwehr et al. 1999). Při zkoumání interakce Vps35p s Vps10p a A-ALP byl v sekvenci odpovídající doméně DPAP-A objeven úsek $^{85}\text{FQFNDIEN}^{92}$, který se zdá být zodpovědný za interakci s Vps35p (Nothwehr et al. 2000).

Dalšími modelovými cargo proteiny pro studium retrográdního transportu jsou Shiga toxin a TGN38 (trans-Golgi network 38). Oba proteiny vyžadují pro retrográdní transport retromer, ale liší se v potřebě SNX (Lieu and Gleeson 2010). Nedávno bylo prokázáno, že existují čtyři typy retromeru, které se liší kombinací SNX. Jedná se o kombinace SNX1/SNX5, SNX1/SNX6, SNX2/SNX5 a SNX2/SNX6 (Wassmer et al. 2009). Metodou RNAi bylo s využitím SNX1 siRNA a SNX2 siRNA zjištěno, že úbytek SNX1 dramaticky ovlivnil transport Shiga toxinu, ale měl jen malý efekt na retrográdní transport TGN38. A opačně, úbytek SNX2 měl jen malý efekt na retrográdní transport Shiga toxinu, zato retrográdní transport TGN38 byl blokován. Zdá se tedy, že TGN38 a Shiga toxin využívají odlišné cesty retrográdního transportu. Tuto hypotézu podporuje i fakt, že TGN38 neprochází při cestě do Golgi recyklujícími ani pozdními endosomy, ale je do Golgi transportován přímo z maturujících časných endosomů. Shiga toxin s největší pravděpodobností podstupuje retrográdní transport cestou přes recyklující endosomy. (Lieu and Gleeson 2010).

Retrográdní transport Shiga toxinu byl také zkoumán spolu s retrográdním transportem ricinu. Dyve et al. objevili zajímavý způsob regulace retrográdního transportu dvou toxinů jedním SNX proteinem, SNX8. V buňkách, ve kterých byl pomocí siRNA proveden „knockdown“ SNX8, došlo ke zvýšení transportu Shiga toxinu z endosomů do TGN a mírnému snížení transportu ricinu z endosomů do TGN. SNX8 tedy možná funguje jako adaptorový protein, který negativně reguluje transport zajišťovaný retromerem, a díky jeho funkci zůstává Shiga toxin v endosomech. Tento fakt navíc ukazuje na pravděpodobnou existenci dvou paralelních cest pro transport z endosomů do TGN v závislosti na regulaci

jedním SNX proteinem. Doménovou strukturou je SNX8 velmi podobný SNX1, má PX i BAR doménu. Navíc částečně lokalizuje spolu s SNX1, SNX2, VPS26 a VPS35 do třídících endosomů, ze kterých je Shiga toxin transportován retrográdní cestou pomocí retromeru (Dyve et al. 2009).

Na možnost existence dvou paralelních cest retrográdního transportu řízeného retromerem poukázal již Burda při studování vlivu komplexu II (Vps15p/Vps34p/Vps30p/Vps38p) na transport CPY a ALP u *S. cerevisiae*. Na základě několika předchozích prací shrnul, že z pozdního Golgi jdou proteiny do vakuoly dvěma cestami:

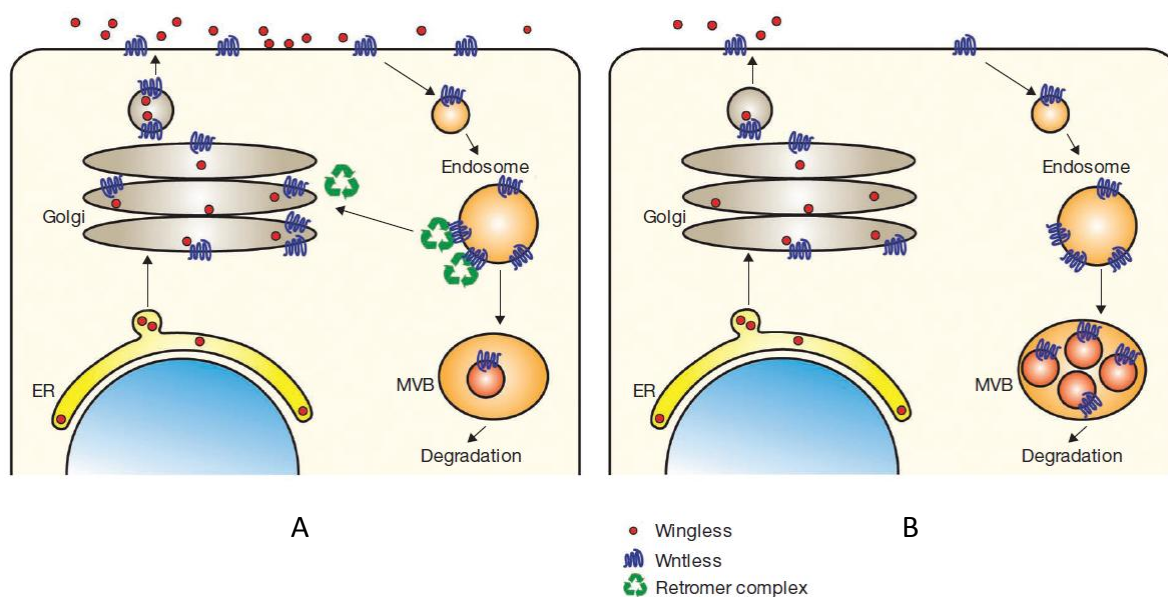
- a) CPY cesta, která vede přes prevakuolární/pozdní endosomy do vakuoly
- b) ALP cesta, která se vyhýbá endosomům.

V kmenech s delecí $\Delta vps30$ nebo $\Delta vps38$ byl pozorován defekt ve zrání CPY, ale žádný problém nenastal u ALP nebo CPS (carboxypeptidase S). Dvojitý mutant $\Delta vps30\Delta vps38$ vykazoval stejný třídící fenotyp v porovnání s každým mutantem zvlášť, z čehož vyplývá, že Vps30p a Vps38p fungují ve společné dráze (Burda et al. 2002).

Dalším důležitým proteinem, který je recyklován pomocí retromeru, je Wntless, receptor pro Wnt, který zajišťuje transport Wnt proteinu z Golgi na buněčný povrch (Belenkaya et al. 2008; Franch-Marro et al. 2008; Pan et al. 2008; Port et al. 2008; Yang et al. 2008). Protein Wntless je znám také jako Evenness Interrupted/Sprinter u *D. melanogaster* a MOM-3/MIG-14 u *C. elegans*, pro zjednodušení bude v následujícím textu používán pro všechny organismy termín Wntless, případně zkratka Wls. O funkci Wntless jakožto receptoru proteinu Wnt svědčí fakt, že v buňkách mutantních v genu *wls* dochází k akumulaci proteinu Wingless (Wg, Wnt protein u *D. melanogaster*) (Port et al. 2008).

Rolí retromeru ve Wnt signalizaci se zabývá více laboratoří. První zmínky pochází z prací na *C. elegans*, ve kterých byl prokázán defekt ve Wnt signalizaci při mutaci podjednotek Vps subkomplexu (kódované geny *vps-26*, *vps-29* a *vps-35*), tedy v té části retromeru, která zodpovídá za výběr cargo proteinů (Coudreuse et al. 2006; Prasad and Clark 2006). V roce 2008 pět pracovních skupin publikovalo své výsledky o úloze retromeru a proteinu Wntless v signalizaci zprostředkované proteiny Wnt rodiny, a to na modelovém organismu *C. elegans* (Pan et al. 2008; Yang et al. 2008) a *D. melanogaster* (Belenkaya et al. 2008; Franch-Marro et al. 2008; Port et al. 2008). Většina z uvedených prací obsahuje i výsledky experimentů provedených v savčích tkáňových kulturách.

Výsledky všech pěti prací jasně ukazují, že retromer má ve Wnt signalizaci důležitou roli a že jeho úloha je konzervovaná pro většinu Wnt proteinů u *C. elegans*, *D. melanogaster* a lidských buněk. Wls je společně s Wnt proteinem transportován z Golgi na plasmatickou membránu, kde dojde k uvolnění Wnt. Wls je následně endocytován a pomocí retromeru dopraven z endosomu zpět do Golgi (Obr. 5a). Knockdown nebo mutace *vps35* ve všech třech modelových systémech způsobila, že Wls byl degradován v lysosomech místo aby byl recyklován do Golgi, a došlo tak k narušení sekrece Wnt (Obr. 5b). Hlavní funkcí retromeru je tak udržování dostatečného množství Wntless v buňce. Na druhou stranu uměle zvýšená exprese Wls zachránila Wnt signalizaci v buňkách mutantních ve *vps35*, což dále potvrzuje, že tyto dva proteiny působí ve stejné dráze. Při porovnání kontrolních buněk s buňkami, které měly narušenou endocytickou dráhu nebo funkci retromeru, došlo všech pět skupin k následujícímu závěru: retromer udržuje množství Wls tím, že inhibuje jeho transport do lysosomů a zároveň zajišťuje jeho doručení do Golgi, odkud může začít nové kolo transportu Wnt na buněčný povrch (Obr. 5) (Belenkaya et al. 2008; Franch-Marro et al. 2008; Pan et al. 2008; Port et al. 2008; Yang et al. 2008).



Obr. 5: Model úlohy Wls a retromeru v sekreci proteinu Wingless.

(A) wild-type buňky: V Golgi se Wingless (Wg) váže na Wls a odsud putují společně na plasmatickou membránu, kde disociují. Wg je tedy volný a může cestovat k cílovým buňkám. Wls je endocytován a z endosomů recyklován pomocí retromeru zpět do Golgi, kde může navázat další Wg.

(B) buňky, ve kterých nefunguje retromer: Wls se spolu s Wg dostává na plasmatickou membránu a po uvolnění Wg je Wls endocytován. Nicméně z endosomů nemůže být navrácen to Golgi, takže se dostává do MVB váčků a následně do lysosomů, ve kterých je degradován.

(Franch-Marro et al. 2008)

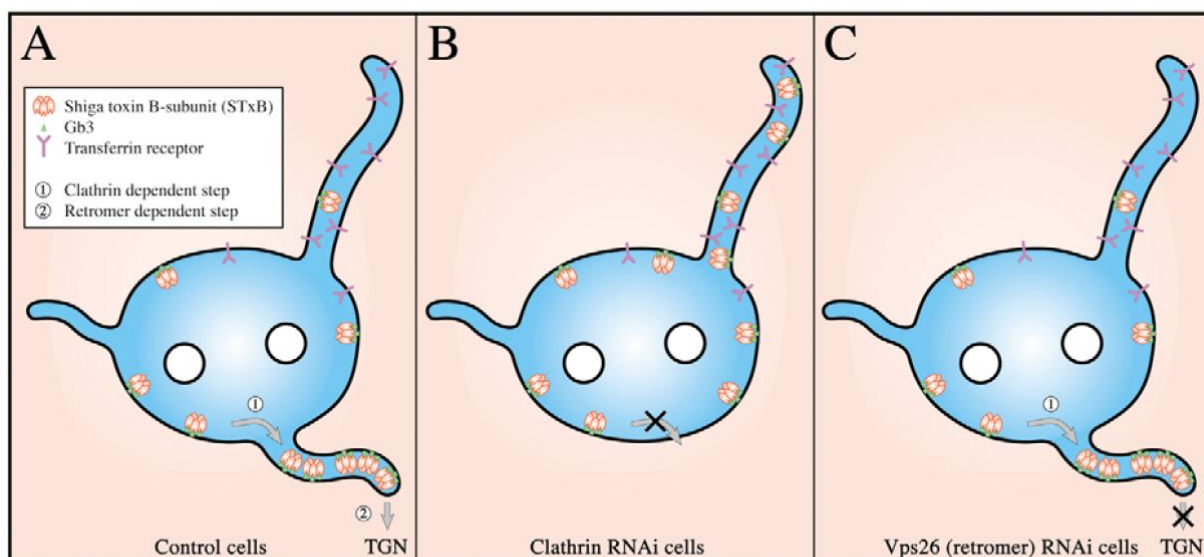
Recyklaci Wls z časných endosomů ovlivňují dva antagonisticky působící proteinové komplexy: kinázový komplex VPS34/VPS15 a fosfatázový komplex MTM-6/MTM-9. Již bylo řečeno, že VPS34/VPS15 je kináza, která fosforyluje PI na PI(3)P. Tím zvyšuje jeho množství v endosomální membráně a umožňuje tak navazování SNX dimerů (Rojas et al. 2008). MTM-6 a MTM-9 jsou proteiny z rodiny myotubularinů a mají fosfatázovou aktivitu – defosforylují PI(3)P na PI. Byly popsány jako proteiny účastníci se endocytózy v coelomocytech u *C. elegans* (Dang et al. 2004) a také jako regulátory množství PI(3)P na membránách endosomů (Taylor et al. 2007). Defosforylací PI(3)P kontrolují navazování SNX na membrány endosomů s Wls, a tím pádem i účinnost recyklace Wls pomocí retromeru. (Silhankova et al. 2010).

5.5. regulace vzniku a odštěpení transportních váčků

Hlavní funkce retromeru spočívá ve vyselektování cargo proteinů určených pro transport do Golgi, případně jejich vydělení do zvláštních membránových domén. Retromer sám o sobě ovšem neumí zajistit odštěpení váčku a jeho dopravení k cílové organelle – Golgi. Vzhledem k tomu, že na plasmatické membráně se tvorby váčků účastní klathrin, stala se role klathrinu při retrográdním transportu a jeho interakce s retromerem předmětem studia několika nedávných prací. Na základě různých pozorování se zdá být pravděpodobné, že retromer a klathrin fungují sekvenčně (Popoff et al. 2007). Sekvenční model, jak ho popisuje Popoff, vypadá následovně:

1. klathrin je potřeba při zrání časných endosomů, u kterých indukuje změny v zakřivení membrány, což vede k vytvoření retrográdních tubulů
(krok 1 = „clathrin dependent step“ v Obr. 6)
2. retromer funguje při dalším zpracovávání, které vede k transportu do membrán TGN/Golgi (krok 2 = „retromer dependent step“ v Obr. 6)

V buňkách, které jsou ochuzené o klathrin (Obr. 6B), nefunguje krok 1 a STxB zůstává asociována s membránami pozitivními na TfnR na tubulárních recyklujících strukturách a zrajících MVB váčkách. V buňkách ochuzených o Vps26 (Obr. 6C) se sice na endosomech formují retrográdní tubuly, ale nemohou být správně zpracovány pro další transport do membrán TGN/Golgi (Popoff et al. 2007).



Obr. 6: **Model retrográdního transportu na časných endosomech.**

(A) V kontrolních buňkách vytváří klathrin mikrodomény, se kterými asociují podjednotky STxB („step 1“).

Vytvoření mikrodomén indukuje počáteční změny v zakřivení membrány a to vede k vytvoření tubulů. V dalším kroku retromer umožní stabilizaci těchto zakřivení a díky tomu se mohou formovat retrográdní tubuly.

(B) V buňkách, které jsou ochuzené o klathrin, se tyto mikrodomény nemohou formovat a retrográdní transport je inhibován.

(C) V buňkách ochuzených o Vps26 se nemohou z retrográdních tubulů tvořit transportní váčky a STxB zůstává zablokovaný v těchto tubulech.

dosud nezmíněné zkratky: Gb3 = glycosphingolipid globotriaosylceramide (buněčný receptor toxinů)

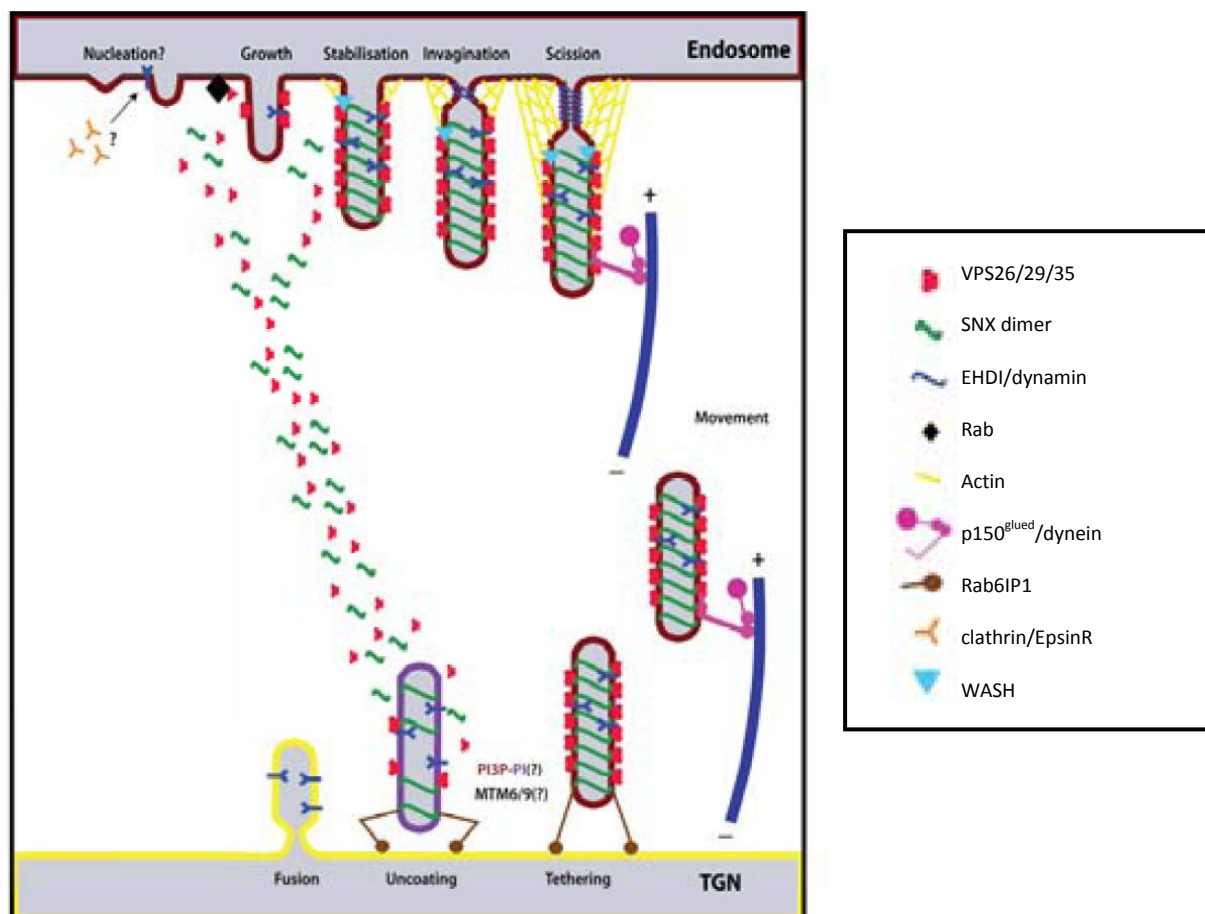
(Popoff et al. 2007)

Takto popsaný model sekvenčního fungování retromeru a klathrinu se zdá být logický, nicméně byly u něj navrženy dvě možné verze (Johannes and Popoff 2008). V principu jde o to, zda se jako první na membránu endosomu váže retromer nebo klathrin. Retromer i klathrin mají schopnost membránu ohýbat – retromer díky BAR doméně proteinů z rodiny SNX (Seaman et al. 1998; Carlton et al. 2004), klathrin vytvořením klathrinové mříže pod membránou. V místech, kde je přítomen retromer i klathrin, potom vznikají vchlípeniny v membráně, které se prodlužují v retrográdní tubuly (Johannes and Popoff 2008).

Dynamika klathrinu na endosomální membráně je proces regulovaný několika dalšími proteiny. Pro koordinovaný retrográdní transport jsou potřeba proteiny RME-8 (receptor-mediated endocytosis-8 protein) a Hsc70 (heat shock cognate protein 70), jehož úlohou je mj. odstraňovat klathrinový plášť. Pokud dojde v buňce k vyčerpání jednoho z těchto proteinů či SNX1, dochází k akumulaci klathrinu na časných endosomech. Funkce RME-8 je rekrutovat

Hsc70 na membrány do míst, kde budou vznikat tubuly. Tím ovlivňuje, zda se v daném místě bude vázat klathrin a následně budou vznikat funkční intermediáty pro retrográdní transport. Protein Hrs (hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate) zprostředkovává interakci retromeru s klathrinovou mříží. Není však jasné, zda se přímo účastní interakce mezi těmito dvěma substráty, nebo je-li jeho funkce pouze na úrovni regulace. Uvedené proteiny dávají vznik dvěma molekulárním modulům, které antagonisticky ovlivňují endosomální klathrinovou dynamiku: SNX1/Hrs a SNX1/RME-8/Hsc70. Je možné, že Hrs a RME-8 kompetují o SNX1 a tím umožňují přepínání mezi navazováním klathrinu (SNX1/Hrs) a jeho „svlékáním“ (SNX1/RME-8/Hsc70). Tím by docházelo k vývoji retrográdního třídění od vzniku tubulů po jejich další zpracování (Popoff et al. 2009).

Tvorby a odštěpování váčků se také aktivně účastní složky cytoskeletu, zvláště pak aktin. Aktinový cytoskelet umí poskytovat dráhu pro motorové proteiny, deformovat membránu a generovat mechanickou sílu, což jsou všechno procesy potřebné pro vytvoření a odštěpení tubulů (McGough and Cullen 2011). Celého procesu se účastní spolu s dalšími proteiny. Nedávno publikovaný model transportu retromerových váčků shrnuje Obr.7 (McGough and Cullen 2011).



Obr. 7: Mechanistické detaily dráhy řízené retromerem.

Toto schéma představuje centrální dogma jakékoli dráhy membránového transportu. V případě účasti retromeru je typické, že specifická kombinace SNX proteinů řídí membránovou tubulaci, která je spojená s tříděním cargo proteinů. Odstřižení váčku/tubulu od endosomální membrány se děje dosud neznámým mechanismem, který by však mohl zahrnovat proteiny z rodiny EHD (podobné dynaminu), aktin a mikrotubulové motory. Asociace SNX dimeru s mikrotubulovým motorem umožňuje pohyb váčku/tubulu směrem k TGN, kde dojde k jeho navázání na membránu TGN. Disociace retromerových subkomplexů by mohla být řízena myotubulariny a následně by došlo k fúzi membrán řízené SNARE proteiny.

dosud nezmíněné zkratky: Rab6IP1 = Rab6 interacting protein 1; WASH = WASP and Scar homolog (McGough and Cullen 2011), upraveno

6. Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo shrnout dosavadní poznatky o retromerem řízené recyklaci proteinů z endosomů do pozdního Golgi. Transport proteinů a jejich ligandů endosomálním systémem je velmi důležitý buněčný proces, ve kterém hraje retromer důležitou roli. V současné době je již hodně známo o struktuře retromeru a rovněž byly dopodrobna popsány jeho interakce s některými cargo proteiny. Nicméně stále existuje řada nezodpovězených otázek a sporných teorií ohledně funkcí retromeru.

Jednou takovou dosud nevyřešenou otázkou je, zda retromer má nebo nemá fosfatázovou aktivitu. Teorie o retromeru jakožto fosfatáze vychází ze studií jeho nejmenší podjednotky VPS29, která vykazuje strukturní homologii s katalytickými podjednotkami fosfatázových enzymů. Proti sobě stojí dvě práce: Damen et al. ukázali, že VPS29 *in vitro* vykazuje nízkou enzymatickou aktivitu vůči peptidu odvozenému od CI-MPR s fosforylovaným serinem a že tato aktivita je významně posílena přítomností VPS35 a VPS26 (Damen et al. 2006). Na druhou stranu Hierro et al. ukazují, že vysoce purifikovaný retromerový komplex nemá vůči peptidu odvozenému od CI-MPR proteinu žádnou fosfatázovou aktivitu (Hierro et al. 2007). Jaký význam by fosfatázová aktivita mohla mít pro retromerem zprostředkovaný transport? Je známo, že fosforylace cytoplasmatické domény CI-MPR zvyšuje jeho afinitu ke klathrinovým adaptorovým proteinům a umožňuje anterográdní transport z TGN do endosomů (Kato et al. 2002). Retromer by tak svou fosfatázovou aktivitou mohl stimulovat opačný děj – defosforylace receptoru by vedla k retrográdnímu transportu.

Dalším nepříliš prozkoumaným bodem retrográdního transportu je způsob dopravení váčků s cargo proteiny do Golgi. Většina prací se shoduje na vytvoření a odštěpení váčku, který následně putuje po mikrotubulech směrem od endosomů k membráně Golgi (přehledně v McGough and Cullen 2011). Jak přesně ale dochází k odštěpení a k navázání retrográdních váčků na cytoskelet a které proteiny jsou pro interakci cytoskeletu s konkrétními váčky zodpovědné, není zcela jasné.

Zajímavým a dosud ne zcela prozkoumaným momentem celé recyklace je vlastní výběr cargo proteinů, přesněji jeho selektivita a závislost na jednotlivých retrográdních komplexech. Bylo popsáno několik různých kombinací SNX podjednotek retromeru a ukazuje se, že jejich počet nemusí být konečný - recyklace proteinu Wntless se například účastní SNX3 (M. Macůrková, osobní sdělení). Jedním z důležitých směrů výzkumu do budoucna tedy zůstává, jakým mechanismem si jednotlivé komplexy vybírají své cargo.

7. Přehled použité literatury:

Arighi, C. N., Hartnell, L. M., Aguilar, R. C., Haft, C. R. and Bonifacino, J. S. (2004) 'Role of the mammalian retromer in sorting of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor', *Journal of Cell Biology* 165(1): 123-133.

Backer, J. M. (2008) 'The regulation and function of Class III PI3Ks: novel roles for Vps34', *Biochemical Journal* 410: 1-17.

Belenkaya, T. Y., Wu, Y. H., Tang, X. F., Zhou, B., Cheng, L. Q., Sharma, Y. V., Yan, D., Selva, E. M. and Lin, X. H. (2008) 'The retromer complex influences Wnt secretion by recycling Wntless from endosomes to the trans-Golgi network', *Developmental Cell* 14(1): 120-131.

Bonifacino, J. S. and Glick, B. S. (2004) 'The mechanisms of vesicle budding and fusion', *Cell* 116(2): 153-166.

Bonifacino, J. S. and Hurley, J. H. (2008) 'Retromer', *Current Opinion in Cell Biology* 20(4): 427-436.

Bonifacino, J. S. and Rojas, R. (2006a) 'Retrograde transport from endosomes to the trans-Golgi network', *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7(8): 568-579.

Bonifacino, J. S. and Rojas, R. (2006b) 'Retrograde transport from endosomes to the trans-Golgi network', *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7(8): 568-579.

Bonifacino, J. S. and Traub, L. M. (2003) 'Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes', *Annual Review of Biochemistry* 72: 395-447.

Burda, P., Padilla, S. M., Sarkar, S. and Emr, S. D. (2002) 'Retromer function in endosome-to-Golgi retrograde transport is regulated by the yeast Vps34 PtdIns 3-kinase', *Journal of Cell Science* 115(20): 3889-3900.

Canuel, M., Lefrancols, S., Zeng, J. and Morales, C. R. (2008) 'AP-1 and retromer play opposite roles in the trafficking of sortilin between the Golgi apparatus and the lysosomes', *Biochemical and Biophysical Research Communications* 366(3): 724-730.

Carlton, J., Bujny, M., Peter, B. J., Oorschot, V. M. J., Rutherford, A., Mellor, H., Klumperman, J., McMahon, H. T. and Cullen, P. J. (2004) 'Sorting nexin-1 mediates tubular endosome-to-TGN transport through coincidence sensing of high-curvature membranes and 3-phosphoinositides', *Current Biology* 14(20): 1791-1800.

Carlton, J., Bujny, M., Rutherford, A. and Cullen, P. (2005a) 'Sorting nexins - Unifying trends and new perspectives', *Traffic* 6(2): 75-82.

- Carlton, J. G., Bujny, M. V., Peter, B. J., Oorschot, V. M. J., Rutherford, A., Arkell, R. S., Klumperman, J., McMahon, H. T. and Cullen, P. J. (2005b) 'Sorting nexin-2 is associated with tubular elements of the early endosome, but is not essential for retromer-mediated endosome-to-TGN transport', *Journal of Cell Science* 118(19): 4527-4539.
- Collins, B. M. (2008) 'The Structure and Function of the Retromer Protein Complex', *Traffic* 9(11): 1811-1822.
- Coudreuse, D. Y. M., Roel, G., Betist, M. C., Destree, O. and Korswagen, H. C. (2006) 'Wnt gradient formation requires retromer function in Wnt-producing cells', *Science* 312(5775): 921-924.
- Cullen, P. J. (2008) 'Endosomal sorting and signalling: an emerging role for sorting nexins', *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9(7): 574-582.
- Damen, E., Krieger, E., Nielsen, J. E., Eygensteyn, J. and van Leeuwen, J. E. M. (2006) 'The human Vps29 retromer component is a metallo-phosphoesterase for a cation-independent mannose 6-phosphate receptor substrate peptide', *Biochemical Journal* 398: 399-409.
- Dang, H., Li, Z., Skolnik, E. Y. and Fares, H. (2004) 'Disease-related myotubularins function in endocytic traffic in *Caenorhabditis elegans*', *Molecular Biology of the Cell* 15(1): 189-196.
- Dyve, A. B., Bergan, J., Utskarpen, A. and Sandvig, K. (2009) 'Sorting nexin 8 regulates endosome-to-Golgi transport', *Biochemical and Biophysical Research Communications* 390(1): 109-114.
- Franch-Marro, X., Wendler, F., Guidato, S., Griffith, J., Baena-Lopez, A., Itasaki, N., Maurice, M. M. and Vincent, J. P. (2008) 'Wingless secretion requires endosome-to-Golgi retrieval of Wntless/Evi/Sprinter by the retromer complex', *Nature Cell Biology* 10(2): 170-U40.
- Ghosh, P., Dahms, N. M. and Kornfeld, S. (2003) 'Mannose 6-phosphate receptors: New twists in the tale', *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4(3): 202-212.
- Griffin, C. T., Trejo, J. and Magnuson, T. (2005) 'Genetic evidence for a mammalian retromer complex containing sorting nexins 1 and 2', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(42): 15173-15177.
- Haft, C. R., Sierra, M. D., Barr, V. A., Haft, D. H. and Taylor, S. I. (1998) 'Identification of a family of sorting nexin molecules and characterization of their association with receptors', *Molecular and Cellular Biology* 18(12): 7278-7287.
- Haft, C. R., Sierra, M. D. L., Bafford, R., Lesniak, M. A., Barr, V. A. and Taylor, S. I. (2000) 'Human orthologs of yeast vacuolar protein sorting proteins Vps26, 29, and 35: Assembly into multimeric complexes', *Molecular Biology of the Cell* 11(12): 4105-4116.

- Hierro, A., Rojas, A. L., Rojas, R., Murthy, N., Effantin, G., Kajava, A. V., Steven, A. C., Bonifacino, J. S. and Hurley, J. H. (2007) 'Functional architecture of the retromer cargo-recognition complex', *Nature* 449(7165): 1063-U8.
- Horazdovsky, B. F., Davies, B. A., Seaman, M. N. J., McLaughlin, S. A., Yoon, S. and Emr, S. D. (1997) 'A sorting nexin-1 homologue, vps5p, forms a complex with vps17p and is required for recycling the vacuolar protein-sorting receptor', *Molecular Biology of the Cell* 8(8): 1529-1541.
- Hurley, J. H. and Hanson, P. I. (2010) 'Membrane budding and scission by the ESCRT machinery: it's all in the neck', *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11(8): 556-566.
- Johannes, L. and Popoff, V. (2008) 'Tracing the Retrograde Route in Protein Trafficking', *Cell* 135(7): 1175-1187.
- Kato, Y., Misra, S., Puertollano, R., Hurley, J. H. and Bonifacino, J. S. (2002) 'Phosphoregulation of sorting signal-VHS domain interactions by a direct electrostatic mechanism', *Nature Structural Biology* 9(7): 532-536.
- Lieu, Z. Z. and Gleeson, P. A. (2010) 'Identification of different itineraries and retromer components for endosome-to-Golgi transport of TGN38 and Shiga toxin', *European Journal of Cell Biology* 89(5): 379-393.
- Marcusson, E. G., Horazdovsky, B. F., Cereghino, J. L., Gharakhanian, E. and Emr, S. D. (1994) 'THE SORTING RECEPTOR FOR YEAST VACUOLAR CARBOXYPEPTIDASE-Y IS ENCODED BY THE VPS10 GENE', *Cell* 77(4): 579-586.
- Mari, M., Bujny, M. V., Zeuschner, D., Geerts, W. J. C., Griffith, J., Petersen, C. M., Cullen, P. J., Klumperman, J. and Geuze, H. J. (2008) 'SNX1 defines an early endosomal recycling exit for sortilin and mannose 6-phosphate receptors', *Traffic* 9(3): 380-393.
- McGough and Cullen 2011; "Accepted Article"; doi: 10.1111/j.1600-0854.2011.01201.x
- Nothwehr, S. F., Bruinsma, P. and Strawn, L. A. (1999) 'Distinct domains within Vps35p mediate the retrieval of two different cargo proteins from the yeast prevacuolar/endosomal compartment', *Molecular Biology of the Cell* 10(4): 875-890.
- Nothwehr, S. F., Ha, S. A. and Bruinsma, P. (2000) 'Sorting of yeast membrane proteins into an endosome-to-Golgi pathway involves direct interaction of their cytosolic domains with Vps35p', *Journal of Cell Biology* 151(2): 297-309.
- Pan, C. L., Baum, P. D., Gu, M. Y., Jorgensen, E. M., Clark, S. G. and Garriga, G. (2008) 'C-elegans AP-2 and retromer control Wnt signaling by regulating MIG-14/Wntless', *Developmental Cell* 14(1): 132-139.
- Piper, R. C. and Katzmann, D. J. (2007) 'Biogenesis and function of multivesicular bodies', *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 23: 519-547.

- Ponting, C. P. (1996) 'Novel domains in NADPH oxidase subunits, sorting nexins, and PtdIns 3-kinases: Binding partners of SH3 domains?', *Protein Science* 5(11): 2353-2357.
- Popoff, V., Mardones, G. A., Bai, S. K., Chambon, V., Tenza, D., Burgos, P. V., Shi, A. B., Benaroch, P., Urbe, S., Lamaze, C. et al. (2009) 'Analysis of Articulation Between Clathrin and Retromer in Retrograde Sorting on Early Endosomes', *Traffic* 10(12): 1868-1880.
- Popoff, V., Mardones, G. A., Tenza, D., Rojas, R., Lamaze, C., Bonifacino, J. S., Raposo, G. and Johannes, L. (2007) 'The retromer complex and clathrin define an early endosomal retrograde exit site', *Journal of Cell Science* 120(12): 2022-2031.
- Port, F., Kuster, M., Herr, P., Furger, E., Banziger, C., Hausmann, G. and Basler, K. (2008) 'Wingless secretion promotes and requires retromer-dependent cycling of Wntless', *Nature Cell Biology* 10(2): 178-U48.
- Prasad, B. C. and Clark, S. G. (2006) 'Wnt signaling establishes anteroposterior neuronal polarity and requires retromer in C-elegans', *Development* 133(9): 1757-1766.
- Raiborg, C. and Stenmark, H. (2009) 'The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins', *Nature* 458(7237): 445-452.
- Rojas, R., Kametaka, S., Haft, C. R. and Bonifacino, J. S. (2007) 'Interchangeable but essential functions of SNX1 and SNX2 in the association of retromer with endosomes and the tracking of mannose 6-phosphate receptors', *Molecular and Cellular Biology* 27(3): 1112-1124.
- Rojas, R., van Vlijmen, T., Mardones, G. A., Prabhu, Y., Rojas, A. L., Mohammed, S., Heck, A. J. R., Raposo, G., van der Sluijs, P. and Bonifacino, J. S. (2008) 'Regulation of retromer recruitment to endosomes by sequential action of Rab5 and Rab7', *Journal of Cell Biology* 183(3): 513-526.
- Schwarz, D. G., Griffin, C. T., Schneider, E. A., Yee, D. and Magnuson, T. (2002) 'Genetic analysis of sorting nexins 1 and 2 reveals a redundant and essential function in mice', *Molecular Biology of the Cell* 13(10): 3588-3600.
- Seaman, M. N. J. (2004) 'Cargo-selective endosomal sorting for retrieval to the Golgi requires retromer', *Journal of Cell Biology* 165(1): 111-122.
- Seaman, M. N. J. (2005) 'Recycle your receptors with retromer', *Trends in Cell Biology* 15(2): 68-75.
- Seaman, M. N. J. (2007) 'Identification of a novel conserved sorting motif required for retromer-mediated endosome-to-TGN retrieval', *Journal of Cell Science* 120(14): 2378-2389.
- Seaman, M. N. J. (2008) 'Endosome protein sorting: motifs and machinery', *Cellular and Molecular Life Sciences* 65(18): 2842-2858.

- Seaman, M. N. J., Harbour, M. E., Tattersall, D., Read, E. and Bright, N. (2009) 'Membrane recruitment of the cargo-selective retromer subcomplex is catalysed by the small GTPase Rab7 and inhibited by the Rab-GAP TBC1D5', *Journal of Cell Science* 122(14): 2371-2382.
- Seaman, M. N. J., McCaffery, J. M. and Emr, S. D. (1998) 'A membrane coat complex essential for endosome-to-Golgi retrograde transport in yeast', *Journal of Cell Biology* 142(3): 665-681.
- Silhankova, M., Port, F., Harterink, M., Basler, K. and Korswagen, H. C. (2010) 'Wnt signalling requires MTM-6 and MTM-9 myotubularin lipid-phosphatase function in Wnt-producing cells', *Embo Journal* 29(24): 4094-4105.
- Taylor, G. S., Maehama, T. and Dixon, J. E. (2000) 'Myotubularin, a protein tyrosine phosphatase mutated in myotubular myopathy, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3-phosphate', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(16): 8910-8915.
- Wassmer, T., Attar, N., Bujny, M. V., Oakley, J., Traer, C. J. and Cullen, P. J. (2007) 'A loss-of-function screen reveals SNX5 and SNX6 as potential components of the mammalian retromer', *Journal of Cell Science* 120(1): 45-54.
- Wassmer, T., Attar, N., Harterink, M., van Weering, J. R. T., Traer, C. J., Oakley, J., Goud, B., Stephens, D. J., Verkade, P., Korswagen, H. C. et al. (2009) 'The Retromer Coat Complex Coordinates Endosomal Sorting and Dynein-Mediated Transport, with Carrier Recognition by the trans-Golgi Network', *Developmental Cell* 17(1): 110-122.
- Yang, P. T., Lorenowicz, M. J., Silhankova, M., Coudreuse, D. Y. M., Betist, M. C. and Korswagen, H. C. (2008) 'Wnt signaling requires retromer-dependent recycling of MIG-14/Wntless in Wnt-producing cells', *Developmental Cell* 14(1): 140-147.